DOI:10.16016/j.1000-5404.201605072

阻断 Kupffer 细胞 IRE1-XBP1 通路对大鼠肝移植排斥反应的影响

王润芝,吴皓,刘一鸣,曹 丁,吴涯昆,李金政,龚建平 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨阻断 Kupffer 细胞 IRE-XBP1 通路对大鼠原位肝移植排斥反应的作用。**方法** 术前用 $GdCl_3$处理或未处理建立大鼠原位肝移植急性排斥反应模型,未处理大鼠随机数字法分为 XBP1-shRNA 组(A 组),Scrambled-shRNA 组(B 组),PBS 组(C 组);处理大鼠随机分为 $GdCl_3$ + XBP1-shRNA 组(D 组),$GdCl_3$ + Scrambled-shRNA 组(E 组),$GdCl_3$ + PBS 组(F 组)。未处理组术后检测血清 ALT、AST、IFN-γ、IL-10、IL-17 的表达水平;RT-PCR 检测 T-bet、RORγt、IFN-γ、IL-17 及 IL-10 mRNA 水平;Western blot 检测 CD86、CD206、IFN-γ、IL-17 及 IL-10 蛋白表达水平,HE 染色观察肝组织结构,根据 Banff 方案进行 RAI 评分,各组剩余大鼠观察术后生存率。处理组术后检测 IFN-γ、IL-17 及 IL-10 mRNA 以及蛋白表达水平,HE 染色观察肝组织结构。**结果** 在未处理组中,与 B、C 组比较,A 组各时间点肝功能指标 ALT、AST 明显下降($P<0.05$),A 组血清表达 IFN-γ、IL-10 明显受到抑制($P<0.05$),IL-10 的表达水平则呈明显上升趋势($P<0.05$),与 RT-PCR 和 Western blot 结果趋势相符合,另外 A 组 CD86 蛋白表明显下降($P<0.05$),而表达 CD206 上升($P<0.05$),T-bet/RORγt mRNA 相对表达量也明显下降($P<0.05$),B、C 组上述指标与 A 组对比则呈相反趋势,而且 B、C 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);A 组 RAI 评分(3.83 ± 0.14),明显低于 B、C 组 RAI 评分(9.13 ± 0.20)、(8.95 ± 0.26)($P<0.05$),并且 A 组大鼠的生存时间明显高于 B、C 组大鼠($P<0.05$)。在处理组中,D、E 和 F 组肝脏局部 IFN-γ、IL-17、IL-10 mRNA 和蛋白表达情况以及病理组织 AcR 程度比较无统计学上的差异($P>0.05$)。**结论** 阻断 IRE1-XBP1 通路促进了 KCs 的 M1 型极化,引起 Th1/Th17 向 Th2/Treg 的免疫偏移,在一定程度上减轻了移植肝脏急性排斥反应的程度。

[关键词] 肌醇酶 1;X 盒蛋白连接蛋白 1;Kupffer 细胞;肝移植;急性排斥反应
[中图法分类号] R392.4;R617;R657.3 [文献标志码] A

Effects of inhibiting IRE1-XBP1 pathway in Kupffer cells in rats after liver transplant rejection

Wang Runzhi, Wu Hao, Liu Yiming, Cao Ding, Wu Yakun, Li Jinzheng, Gong Jianping (Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of inhibiting inositol requiring 1-X-Box binding protein 1 (IRE1-XBP1) pathway in Kupffer cells (KCs) on liver transplant rejection in rats. **Methods** Orthotopic liver transplantation in rats was established with or without $GdCl_3$ treatment pre-operation. In untreated group, the rats were divided randomly into 3 subgroups, that is, XBP1-shRNA group (A), Scrambled-shRNA group (B), and PBS group (C). Likewise, the treated group was sub-divided into $GdCl_3$ + XBP1-shRNA group (D), $GdCl_3$ + Scrambled-shRNA group (E), and $GdCl_3$ + PBS group (F). In untreated group, the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-10 (IL-10) and IL-17 were examined at different time points after operation. Liver tissues were excised for hematoxylin and eosin (HE) staining, mRNA expression levels of transcriptional factors (T-bet and RORγt) and cytokines (IFN-γ, IL-17 and IL-10) quantified by real-time PCR (RT-PCR), and protein levels of CD86, CD206, IFN-γ, IL-17 and IL-10 by Western blotting. Banff schema was used for grading the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81200329, 81300364)
[通信作者] 龚建平,E-mail:gongjianping11@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160831.1411.011.html

acute allograft rejection with rejection activity index (RAI). The survival rate was assessed by Kaplan-Meier curve analysis. In the treated group, the mRNA and the protein expression of IFN-γ, IL-17 and IL-10 was also tested. **Results** In the untreated group, the serum levels of ALT and AST at different time points were significantly lower in group A compared with groups B and C ($P<0.05$). In group A, IFN-γ and IL-17 were significantly decreased in serum while IL-10 was significantly increased ($P<0.05$). There were consistent with the results of RT-PCR and western blotting. In addition, the relative mRNA expression of T-bet/RORγt was decreased, protein expression of CD86 decreased and CD206 increased, which were all statistically significant ($P<0.05$). In contrast, groups B and C showed inverse trend with respect to the above-mentioned factors, mRNA and protein expressions. Moreover, the differences between group B and C were not significant. The mean RAI score in group A was 3.81 ± 0.14, which was significantly lower than that in groups B (9.13 ± 0.20) and C (8.95 ± 0.26), respectively ($P<0.05$). The data was also in agreement with the Kaplan-Meier curve, showing that rats in group A significantly survived longer than these in groups B and C ($P<0.05$). However, the expression of IFN-γ, IL-17 and IL-10 both at mRNA and protein levels was not significantly different among the treatment groups D, E, and F. The same results in pathological examination were observed. **Conclusion** The blockage of IRE1-XBP1 pathway could alter the polarization of KCs from M1 to M2 type, lead to skewing of Th1/Th17 towards Th2/Treg, and consequently ameliorate acute rejection following liver transplantation in rats.

[**Key words**] inositol enzyme 1; X-box binding protein 1; Kupffer cells; liver transplantation; acute rejection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81200329, 81300364). Corresponding author: Gong Jianping, E-mail: gongjianping11@126.com

同种异体肝移植已成为治疗终末期肝病的首选方法,但是供肝移植术后免疫排斥反应是影响移植物功能以及患者生存质量的重要因素[1-3]。近年来研究表明,肌醇酶1-X盒蛋白连接蛋白-1(inositol requiring 1-X-box binding protein 1, IRE1-XBP1)在调控神经退化性疾病[4]、炎症性疾病[5]、代谢性疾病[6]以及肿瘤的生长转化[7]等引起了广泛关注。IRE1是一种跨内质网膜的丝/苏氨酸受体蛋白激酶,其磷酸化激活后,可使XBP1的mRNA发生剪切,形成具有生物活性的XBP1s转入核内,调节相关基因的转录和翻译。XBP1是具有分泌功能的细胞所必须,同时也参与了外分泌细胞的分泌作用[8]。在肝脏中,Kupffer细胞(KCs)作为体内重要的分泌免疫细胞,能够产生大量的炎症介质,从而影响Th1/Th17以及Th2/Treg细胞的分化平衡[9],因此推测XBP1可能在调控Kupffer细胞免疫功能方面具有重要作用。本实验通过经门静脉注射携带XBP1-shRNA慢病毒,从体内阻断KCs的IRE1-XBP1通路的活性,用来探讨其是否能够诱导肝移植免疫耐受的形成。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

实验动物:健康雄性10~12周龄雄性Lewis(Rt11)大鼠69只,体质量220~260 g,健康雄性10~12周龄Brown Norway(BN,Rt1n)大鼠69只,体质量200~260 g,均购自于重庆医科大学动物实验中心。大鼠饲养于恒温、非特殊病原菌(SPF)级实验室。给予标准鼠料喂养,给予12 h昼夜节律,正常饮水。术前8~12 h禁食。所有操作遵守重庆医科大学伦理委员会发布的伦理及管理指南。主要试剂:XBP1-shRNA重组慢病毒由上海Invitrogen生物科技公司代为构建;总RNA提取试剂盒购自美国Promega公司;PCR引物由广州复能基因有限公司合成;大鼠CD86、CD206、IL-10、IL-17、IFN-γ单克隆抗体购自碧云天生物技术公司;ELISA试剂盒购自美国Active motif公司;总蛋白提取试剂购自武汉谷歌生物技术有限公司。

1.2 大鼠原位肝移植模型建立及分组

采用改良的Kamada"二袖套管"法[10]建立LEWIS→BN大鼠大鼠配对组合的的原位肝移植(ROLT)急性排斥反应模型。实验动物数字法分为3组:(1)XBP1-shRNA组(A组,$n=18$),经门静脉注射含XBP1-shRNA慢病毒(1×10^9 Tu/mL)的1 mL PBS;(2)Scrambled-shRNA组(B组,$n=18$),经门静脉注射含Ctrl-shRNA慢病毒(1×10^9 Tu/mL)的1 mL PBS;(3)PBS组(C组,$n=18$),经门静脉注射1 mL PBS。术后记录受

体大鼠的精神情况、活动情况、对外界刺激源反应情况。并于术后1、3 d和7 d各组随机数字法取3只大鼠处死,开腹后下腔静脉穿刺取血2 mL,离心5 min,上清液-80 ℃保存。术后7 d各组再处死2只大鼠(每组各5只),取部分中及左叶组织、液氮保存。余部分固定包埋。各组剩余大鼠观察术后生存率。

术前24 h,乙醚麻醉下经LEWIS大鼠尾静脉注入10 mg/kg $GdCl_3$(氯化钆),24 h后再将供肝移植到SD大鼠体内,之后处理如上述分组处理情况,实验动物随机数字法分为$GdCl_3$ + XBP1-shRNA组(D组,$n=5$),$GdCl_3$ + Scrambled-shRNA组(E组,$n=5$),$GdCl_3$ + PBS组(F组,$n=5$)。术后7 d处死各组大鼠(每组各5只),取部分中及左叶组织、液氮保存。余部分固定包埋。

1.3 血清肝功能及细胞因子测定

使用全自动生化分析仪(BECKMAN CX7)分析未用$GdCl_3$预处理组各时段大鼠血清中ALT、AST水平。根据ELISA试剂盒说明,检测各时段外周血中IFN-γ、IL-10、IL-17的表达水平。每组实验重复3次。

1.4 Real-time PCR检测肝组织中IFN-γ、IL-17及IL-10 mRNA表达水平

按Trizol试剂盒说明书提取肝脏总组织RNA。T-bet上游引物5′-AACCAGTATCCTGTTCCCAGC-3′,下游引物5′-TGTCGCCACTGGAAGGATAG-3′;RORγt上游引物5′-TCTGGAAGCTGTGGGATAGA-3′,下游引物5′-GAGGAGCCTGTGGAGAAATAC-3′;IL-10上游引物5′-CTGCTATGTTGCCTGCTCTT-3′,下游引物5′-ATGTGGGTCTGGCTGACTGG-3′;IFN-γ上游引物5′-ATGAACGCTACACACTGCATC-3′,下游引物5′-TAGGCTTTCAATGACTGTC-3′;IL-17上游引物5′-CTCAACCGTTCCACGTCACCCT-3′,下游引物5′-CCAGCTTTCCCTCCGCATT-3′;β-actin上游引物5′-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3′,下游引物5′-CCAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3′。反转录后行荧光定量PCR,用Quantity One 4.62图像分析软件行光密度值测定,目的片段与β-actin光密度之比值作为目的片段mRNA相对表达量。

1.5 Western blot检测移植肝中CD86、CD206、IFN-γ、IL-17及IL-10蛋白表达水平

按照总蛋白提取试剂盒说明书提取各组组织总蛋白,并进行含量测定,常规行Western blot测定,一抗浓度稀释成1∶500;二抗浓度稀释成1∶2 000。显影后扫描,然后用UVP凝胶图像处理系统软件分析目的条带的灰度值。

1.6 肝组织病理观察

取移植肝组织放入10%甲醛中固定24 h,常规脱水→二甲苯透明→石蜡包埋→3 μm厚切片→脱蜡、脱水→HE染色,400倍光学显微镜观察;根据Banff方案进行急性排斥反应分级。

1.7 数据处理和统计学分析

用SPSS 18.0统计软件对所有数据进行正态性检验,呈正态分布的数据用$\bar{x} \pm s$表示,非正态分布数据用中位数表示。对正态分布数据采用参数检验,非正态分布数据采取秩和检验或卡方检验。Kaplan-Meier法绘制生存曲线,采用Log-rank分析比较体内实验各组间生存率差异。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝移植后生存情况比较

各组动物手术过程顺利。其中,B、C组受体大鼠术后精神差,进食进饮少,尿液黄,活动少,而A组受体大鼠术后精神好,运动量正常,进食进饮多,尿液稍黄,对外界反应可,A组大鼠生存率明显高于B、C组大鼠,且差异具有统计学意义($P<0.05$),提示转染XBP1-shRNA能有效延长移植后受体的生存时长,见图1。

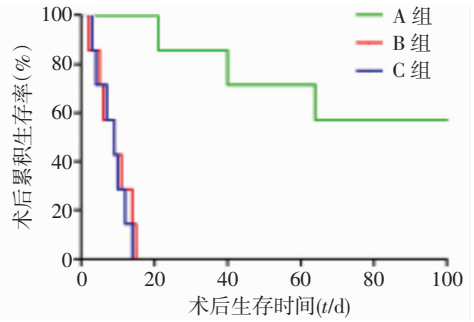
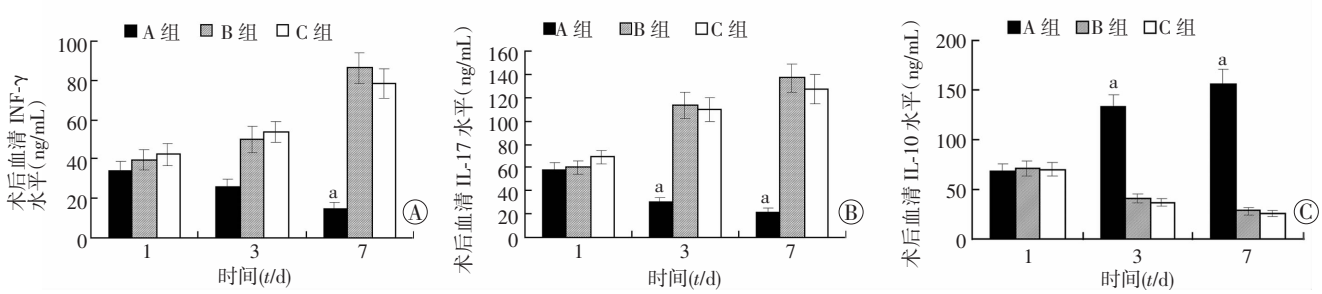


图1 各组大鼠Kaplan-Meier生存曲线

2.2 大鼠肝移植后血清细胞因子以及肝功能比较

2.2.1 血清IFN-γ、IL-17、IL-10

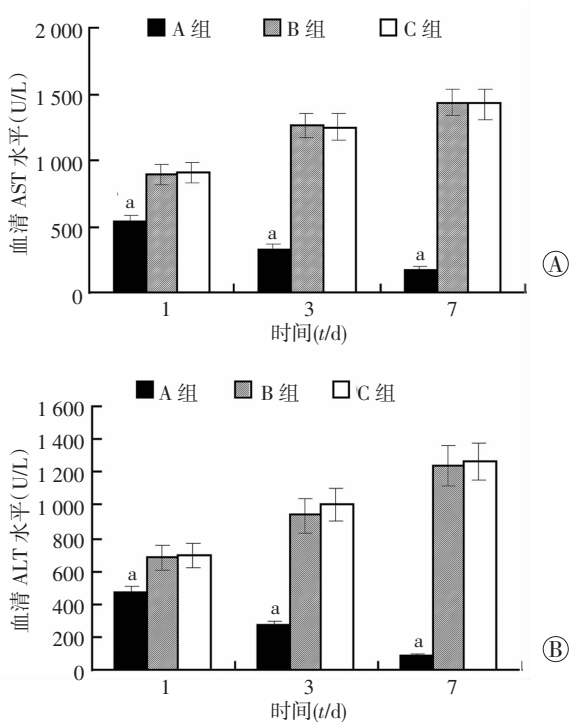
各组大鼠血清ELISA结果显示:术后1、3 d和7 d,外周血中IFN-γ、IL-17和IL-10的表达水平见图2。A组大鼠血清IFN-γ和IL-17水平随着时间逐渐降低,IL-10水平逐渐升高,而B、C组大鼠血清IFN-γ和IL-17水平随着时间逐渐升高,IL-10水平逐渐降低,且A组大鼠于3、7 d时IFN-γ、IL-17和IL-10水平与B、C组大鼠比较有统计学差异($P<0.05$),B组和C组比较无明显区别($P>0.05$),其结果提示阻断体内IRE1-XBP1通路可上调血清中抗炎因子浓度,并抑制促炎因子的表达,有利于调控Th亚群平衡偏倚,见图2。



A:IFN-γ;B:IL-17;C:IL-10　a:$P<0.05$,与 B、C 组比较

图 2　术后不同时间点大鼠血清 IFN-γ、IL-17、IL-10 比较

2.2.2　血清 AST、ALT　　术后检测各组大鼠肝功能情况结果显示:A 组大鼠术后各时间点血清 AST、ALT 水平明显低于 B、C 组大鼠($P<0.05$),并且随着时间肝功能逐渐好转,而 B、C 组大鼠 AST、ALT 水平逐渐升高,两组之间各时间点含量水平比较无统计学意义的差别($P>0.05$),见图 3。

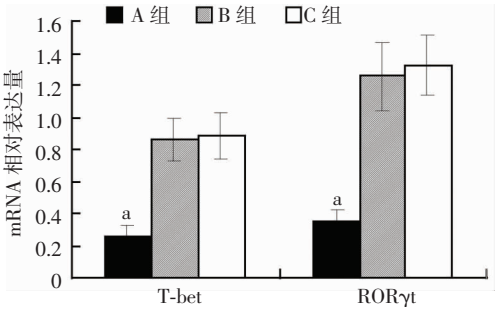


A:AST; B:ALT　a:$P<0.05$,与 B、C 组比较

图 3　术后不同时间点大鼠血清 AST、ALT 比较

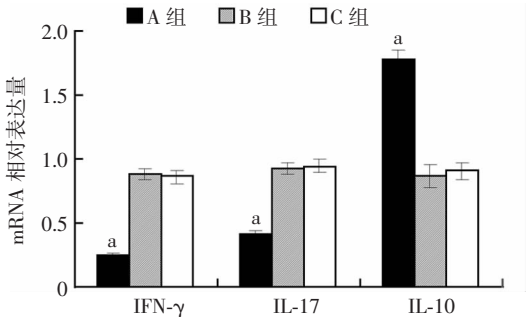
2.3　大鼠肝组织 T-bet、RORγt、IFN-γ、IL-17 及 IL-10 mRNA 表达水平

T-bet 和 RORγt 分别作为 Th1 细胞和 Th17 细胞的关键转录因子,通过 RT-PCR 检测对各组大鼠肝组织 T-bet 和 RORγt mRNA 表达情况,以此来评估 XBP1 对诱导 Th 细胞亚群平衡偏移中的效用,其结果示:A、B、C 三组 T-bet 和 RORγt mRNA 表达水平分别为(0.26 ±0.07)、(0.35 ±0.08),(0.86 ±0.13)、(1.26 ±0.21),(0.89 ±0.15)、(1.32 ±0.19)。A 组明显低于 B、C 两组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 B、C 组比较无统计学上的差异($P>0.05$),见图 4。此外,我们还检测了移植肝脏局部 IFN-γ、IL-17 及 IL-10 mRNA 的差异表达,其中 A 组 IFN-γ、IL-17 表达水平分别为(0.25 ±0.05)、(0.41 ±0.08),显著低于 B 组[(0.88 ±0.10)、(0.93 ±0.13)]和 C 组[(0.86 ±0.11)、(0.95 ±0.12)]($P<0.05$),A 组 IL-10 的表达则呈现相反趋势,与 B、C 组比其 mRNA 转录水平明显得到上调($P<0.05$),见图 5。



a:$P<0.05$,与 B、C 组比较

图 4　术后 7 d 移植肝脏中 T-bet、RORγt mRNA 表达水平



a:$P<0.05$,与 B、C 组比较

图 5　术后 7 d 移植肝脏中 IFN-γ、IL-17、IL-10 mRNA 表达水平

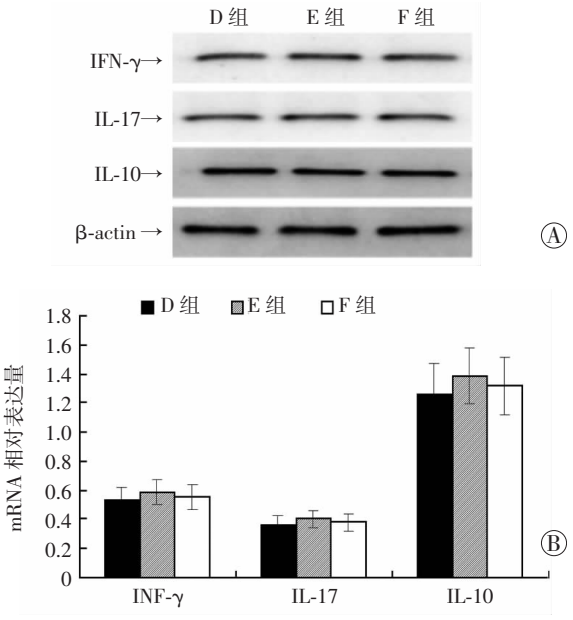
$GdCl_3$具有抑制 KCs 细胞吞噬、分泌功能的作用,我们用 $GdCl_3$预处理 LEWIS 大鼠行异体肝移植,并检测了各组移植肝脏局部 IFN-γ、IL-17 及 IL-10 mRNA 的表达发现,D 组、E 组和 F 组之间比较无统计学上的差异($P>0.05$),见图 6。

2.4　大鼠肝组织中 CD86、CD206、IFN-γ、IL-17 及 IL-10 蛋白表达水平

肝移植术后 7 d,通过 Western blot 检测各组大鼠不同极性 KCs 表面标志性分子 CD86、CD206 以及细胞因子 IFN-γ、IL-17、IL-10 的蛋白表达水平,结果示:A、B、C 组 CD86、CD206 的相对蛋白表达水平分别为(0.21±0.03)、(1.23±0.08),(0.94±0.08)、(0.44±0.06),(0.97±0.07)、(0.46±0.06),A 组 M1 型 KCs 的标志性表面分子 CD86 的蛋白表达水平较 B、C 组明显受到抑制($P<0.05$),而 M2 型 KCs 标志性表面分子 CD206 的蛋白表达水平则显著增高($P<0.05$),B、C 组比较无统计学意义的差异($P>0.05$)。这提示 A 组中 M2 型的 KCs 比例较 M1 型增多,B、C 组则呈相反趋势;A、B、C 组 IFN-γ、IL-17 及 IL-10 的相对蛋白表达水平分别为(0.37±0.04)、(0.14±0.03)、(1.13±0.08),(0.87±0.07)、(1.05±0.09)、(0.36±0.04),(0.85±0.08)、(1.07±0.10)、(0.34±0.04),其中 A 组 IFN-γ、IL-17 分泌明显受到抑制且低于 B、C 组,而 IL-10 的相对表达量则较其余两组显著增高($P<0.05$),B、C 组之间比较无统计学意义的差异($P>0.05$),见图 7。另外,我们用 $GdCl_3$预处理 LEWIS 大鼠行异体肝移植,并检测了各组移植肝脏局部 IFN-γ、IL-17 及 IL-10 蛋白表达情况发现,D 组、E 组和 F 组之间比较无统计学上的差异($P>0.05$),见图 7,这提示在未用 $GdCl_3$预处理大鼠时,XBP1 慢病毒在一定程度上成功转染 KCs,并且 KCs 在诱导免疫耐受中发挥了主要的作用。

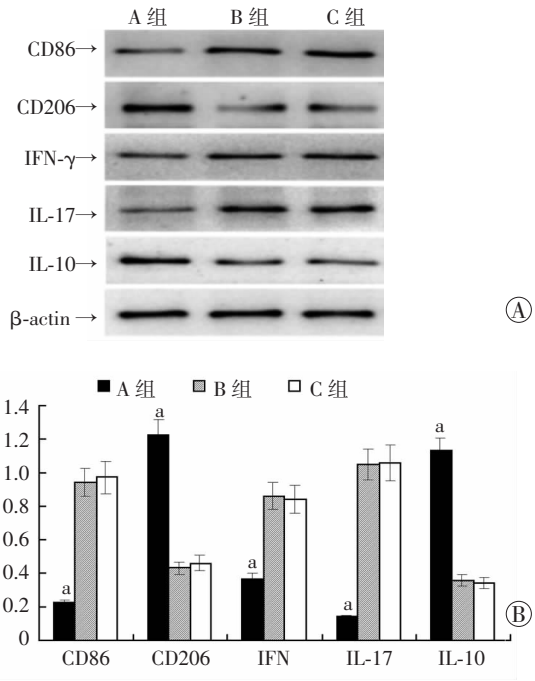
2.5　肝脏组织病理学改变

肝移植术后 7 d,分别对各组大鼠肝脏行 HE 染色,切片置于光学显微镜下观察病理学改变情况发现,A 组 Banff 评分 RAI 得分为(3.83±0.14),判定至为轻度排斥反应,镜下可见汇管区少量淋巴细胞浸润,胆管和血管形态尚可,未见明显侵犯。而在 B、C 组中,RAI 得分分别为(9.13±0.20)、(8.95±0.26),达到中至重度排斥反应,镜下可见肝细胞排列紊乱,部分肝细胞变性坏死,汇管区大量淋巴细胞浸润,胆管及血管受累,偶见局部出血及坏死,A 组与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 8。另外,D 组、E 组、F 组 Banff 评分 RAI 得分分别为(7.65±0.15)、(7.93±0.17)、(7.87±0.16),达到中至重度排斥反应,且各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 9。



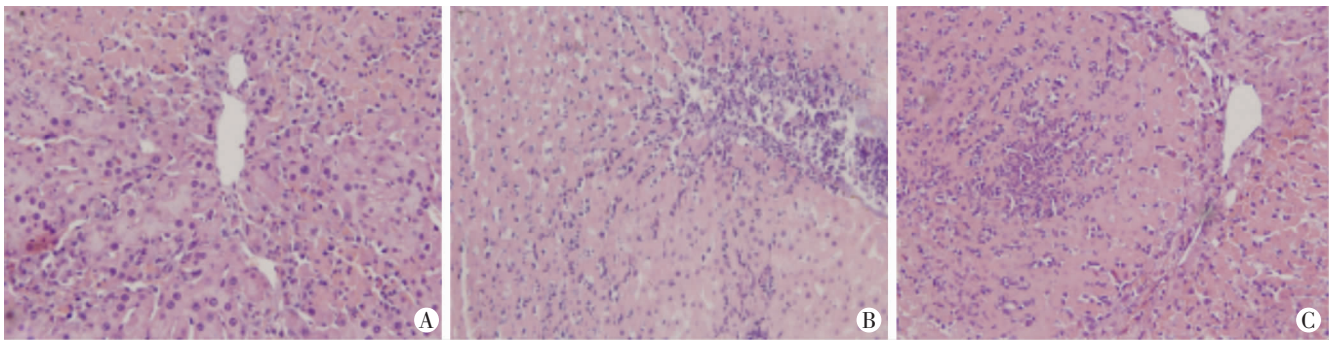
A:蛋白表达结果;B:mRNA 表达水平

图 6　术后 7 d 移植肝脏中($GdCl_3$处理)IFN-γ、IL-17 及 IL-10 蛋白及 mRNA 表达水平



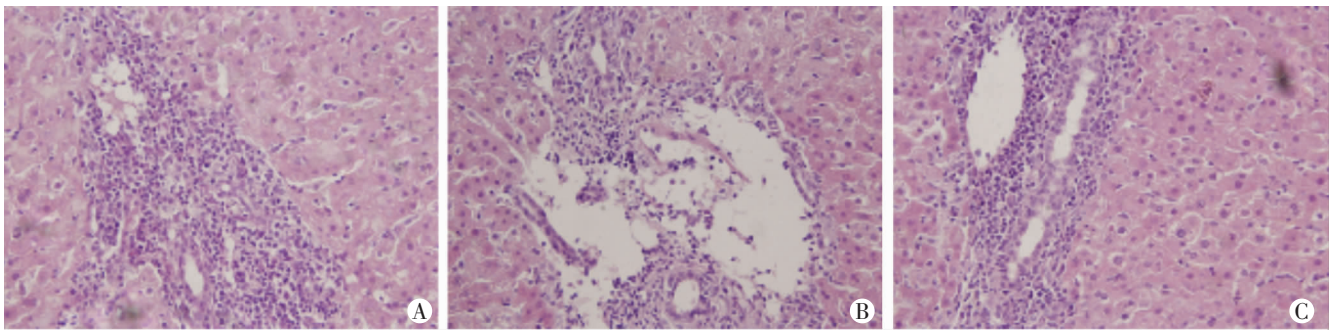
A:Western blot 结果;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 B、C 组比较

图 7　术后 7 d 移植肝脏中 CD86、CD206、IFN-γ、IL-17 及 IL-10 蛋白表达水平



A:XBP1-shRNA 组;B:Scrambled-shRNA 组;C:PBS 组

图 8 术后 7 d 肝脏病理组织学表现 (HE×400)



A:$GdCl_3$ + XBP1-shRNA 组;B:$GdCl_3$ + Scrambled-shRNA 组;C:$GdCl_3$ + PBS 组

图 9 术后 7 d 肝脏($GdCl_3$处理)病理组织学表现 (HE×400)

3 讨论

在大量如内毒素、病原菌等刺激时,就会导致内质网处于功能紊乱,即内质网应激状态(endoplasmic reticulum stress, ERS),此时细胞就会启动一组细胞内信号传导通路,产生大量的非正常折叠的蛋白质,增加细胞对内质网压力应激的耐受性的一种保护性机制——非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以此来避免 ERS 导致的细胞凋亡[6,8,11]。其中 IRE1 就是最重要的核心通路之一,研究表明 ERS 状态下,内质网腔的结构域发生二聚化,激活胞质的蛋白激酶,进而发生自身的磷酸化,激活其内切核糖核酸酶的活性,从而特异性的剪切含亮氨酸拉链域的高转录因子 XBP1,产生具有高生物学效能的剪切型 XBP1s,调控下游 UPR 靶分子基因的转录[12]。而敲除了 IRE1 基因的细胞在内质网降解功能方面有缺陷[13]。随着对 IRE1-XBP1 通路的深入研究,发现其不仅参与了机体代谢过程、肿瘤生长等,而且还参与了各种炎症疾病的发展。研究发现,XBP1 是维持 DCs 发育、存活的关键因子,XBP1 基因抑制小鼠 DCs 及类浆细胞数量减少[14-15]。在炎症情况下,TLR2 和 TLR4 促发的 IRE1 活化可促进巨噬细胞持续分泌炎症因子(IL-6, TNF-α, IL-8, MCP1, CXCL3, VCAM-1, ICAM-1 等)[5],还可以通过调控 Beclin-1 蛋白的表达增强内皮细胞自噬作用[16]。而沉默小鼠 XBP1 的表达,炎症因子分泌明显下降,宿主天然免疫反应减弱[17]。由此可见,IRE1-XBP1 通路可能参与了 APC 功能改变以及 Th1/Th17 类免疫反应的调节。但 IRE1-XBP1 在实质器官移植,特别是肝脏移植中的作用目前尚不清楚。

辅助性 T 细胞(T help cells Th)是 T 淋巴细胞最重要的一组亚群。Th1/Th2/Th17/Treg 之间动态平衡偏移也是决定急性排斥反应(AcR)发生与否的重要环节。Th1 与 Th17 细胞主要促进 AcR 的发生发展,而 Th2/Treg 则有利于抑制局部免疫反应[18]。KCs 细胞作为肝血窦内的固有巨噬细胞群,是机体最大的抗原递呈细胞群,是肝脏具有致耐受免疫原性的重要组成,因此其功能状态在 Th1/Th17 以及 Th2//Treg 平衡偏移上由着至关重要的调节作用[9,18]。氯化钆具有抑制 KCs 细胞吞噬、分泌功能的作用,大鼠实验模型证实,氯化钆在 24 h 内可有效破坏 80% 的 KCs 的作用。静脉注射氯化钆,可阻断 KCs 抗原提呈,以及抑制其 NF-κB 活性,减少免疫相关因子的产生和释放,同时调节 Th2 的偏移,增加 Th2 类细胞因子的产生,在免疫耐受形成中具有一定的作用[19]。在本实验中,我们通过建立大鼠肝移植急性排斥反应模型,门静脉注射携带沉默 XBP1 的慢病毒,观察术后大鼠各项指标发现,与 B、C 组比较,A 组大鼠肝脏 KCs 表达 M1 型分子 CD86 明显下降,而表达 M2 型分子 CD206 上升,Th1/Th17

的关键转录因子 T-bet/RORγt 的相对表达量也明显下降,且 Th1/Th17 类细胞因子 IFN-γ 和 IL-17 的基因和蛋白表达水平以及外周血清中的含量也都呈抑制状态,而 Th2 类细胞因子 IL-10 的表达水平则呈明显上升趋势,肝功能指标 AST、ALT 随着时间逐渐好转,B、C 组上述指标则呈相反趋势,而且 B、C 组比较无统计学意义的差异。从肝组织病理学表现可以看出,A 组肝组织的 AcR 程度集中于轻~中度,而 B、C 组肝组织的 AcR 程度集中于中~重度,并且 A 组大鼠的生存时间明显高于 B、C 组大鼠。与此同时,我们还对 LEWIS 大鼠进行氯化钆预处理行异体肝移植,检测相关炎症指标,结果发现各组间无明显差异,从病理组织上看,D、E 和 F 组 AcR 程度集中于轻~中度,但三组见未见明显差异,这也表明了在未用 $GdCl_3$ 预处理大鼠时,XBP1 慢病毒在一定程度上成功转染 KCs,并且 KCs 在肝脏诱导免疫耐受中发挥了主要的作用,但未发现阻断 KCs 的功能和阻断 KCs XBP1 表达在免疫耐受中的联合作用。因此,阻断 IRE1-XBP1 通路促进了 KCs 的 M1 型极化,引起 Th1/Th17 向 Th2/Treg 的免疫偏移,减轻了肝脏 AcR 的程度,明显改善急性排斥反应模型受体的预后。

总之,抑制 IRE1-XBP1 通路活性,可改变肝脏 KCs 极化,诱导 Th1/Th2 和 Th17/Treg 免疫平衡,延长受体存活率,抑制 AcR 对移植肝的破坏、保护肝功能,实现免疫耐受微环境的诱导形成,有望在移植排斥反应的治疗中发挥潜在的作用,可能为器官移植诱导免疫耐受的临床治疗开拓新的途径。

参考文献:

[1] Kinnear G, Jones N D, Wood K J. Costimulation blockade: Current perspectives and implications for therapy[J]. Transplantation, 2011, 95(4): 527 - 535. DOI: 10.1097/TP.0b013e31826d4672

[2] Yoshida O, Dou L, Kimura S, *et al*. CD39 deficiency in murine liver allografts promotes inflammatory injury and immune-mediated rejection[J]. Transpl Immunol, 2015, 32(2): 76 - 83. DOI: 10.1016/j.trim.2015.01.003

[3] 中华医学会器官移植学分会,中华医学会外科学分会移植学组, 中国医师协会器官移植医师分会. 中国肝癌肝移植临床实践指南(2014 版)[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(7): 497 - 501. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673 - 9752.2014.07.001

[4] Vidal R L, Figueroa A, Court F A, *et al*. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(10): 2245 - 2262. DOI: 10.1093/hmg/dds040

[5] Martinon F, Chen X, Lee A H, *et al*. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages[J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 411 - 418. DOI: 10.1038/ni.1857

[6] Wu R, Zhang Q H, Lu Y J, *et al*. Involvement of the IRE1a-XBP1 Pathway and XBP1s-Dependent Transcriptional Reprogramming in Metabolic Diseases[J]. DNA Cell Biol, 2015, 34(1): 6 - 18. DOI: 10.1089/dna.2014.2552

[7] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, *et al*. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2012, 44(6): 694 - 698. DOI: 10.1038/ng.2256

[8] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. Science, 2011, 334(6059): 1081 - 1086. DOI: 10.1126/science.1209038

[9] Chen G S, Qi H Z. Effect of Kupffer cells on immune tolerance in liver transplantation[J]. Asian Pac J Trop Med, 2012, 5(12): 970 - 972. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60184-9

[10] Peng Y, Gong J P, Liu C A, *et al*. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(19): 2890 - 2893.

[11] Jiang D, Niwa M, Koong A C. Targeting the IRE1-XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases[J]. Semin Cancer Biol, 2015, 33: 48 - 56.

[12] Oishi N, Duscha S, Boukari H, *et al*. XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(5): e1763. DOI: 10.1038/cddis.2015.108

[13] Guo F, Lin E A, Liu P, *et al*. XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stressresponse[J]. Cell Signal, 2010, 22(12): 1818 - 1828. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.07.006

[14] Malhi H, Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. J Hepatol, 2011, 54(4): 795 - 809. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.005

[15] Cubillos-Ruiz J R, Silberman P C, Rutkowski M R, *et al*. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis[J]. Cell, 2015, 161(7): 1527 - 1538. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.025

[16] Tian P G, Jiang Z X, Li J H, *et al*. Spliced XBP1 promotes macrophage survival and autophagy by interacting with Beclin-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(4): 518 - 523. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.061

[17] Knechtle S J, Kwun J. Unique aspects of rejection and tolerance in liver transplantation[J]. Semin Liver Dis, 2009, 29(1): 91 - 101. DOI: 10.1055/s-0029-1192058

[18] Böttcher J P, Knolle P A, Stabenow D. Mechanisms Balancing Tolerance and Immunity in the Liver[J]. Dig Dis, 2011, 29(4): 384 - 390. DOI: 10.1159/000329801

[19] Diaz-Peromingo J A, Gonzalez-Quintela A. Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation[J]. Eur Surg Res, 2005, 37(1): 45 - 49.

(**收稿**:2016-05-16;**修回**:2016-07-08)

(编辑 邓强庭)